操作手順

CONTENTS

I. 菌希釈液の調製
II. サンプルからの遺伝子抽出
III. 試薬の調製
IV. 試薬分注およびサンプル溶液の添加
V. LAMP反応および検出
VI. 結果判定
VII. 検査フローチャート
VIII. アッセイシート

Ⅰ．菌希釈液の調製　Ⅱ．サンプルからの遺伝子抽出

❑ 菌希釈液の調製 (図9) 【領域B】

【領域B にて操作します】

① 食品微生物検査で腸管出血性大腸菌と疑われた被検菌株を培養した寒天培地から滅菌綿棒を使いコロニーを採取します。

② 滅菌蒸留水に懸濁し、McFarland No.1 (3.0×10^8 CFU/mL) に調製する。

③ さらに、滅菌蒸留水で100倍に希釈する。菌希釈液は3.0×10^6 CFU/mLに調製される。

❑ サンプルからの遺伝子抽出 (図9) 【領域B】

❖ コンタミネーションの原因となるので、チューブのフタの内側には触れないでください。

【領域B にて操作します】

④ 滅菌チューブ (1.5mL) にExtraction Solution for Foods (EX F) 50μLを分注します。

▧ EX Fは融解後、混和し、微量簡易遠心機で数秒間遠心 (スピンダウン) してから使用してください。

❖ EX Fは空気に触れると徐々に劣化するので、チューブに分注後は速やかに増菌培養液を添加してください。

⑤ 菌希釈液50μLをそれぞれ滅菌チューブ (1.5mL) に添加し、キャップを閉めます。

⑥ ボルテックスミキサーまたは転倒混和で攪拌後、微量簡易遠心機でスピンダウンします。

⑦ 95°C、5分間の加熱処理を行います。

▧ この操作により感染性がなくなります。

❖ 95°C加熱中に、空気の膨張によりチューブのフタが開いてしまうことがありますので、ご注意ください (キャップロックなどを使用することを推奨します)。⑧ 微量簡易遠心機で室温にて1分間遠心します。

⑨ 氷上に移し、上清をサンプル溶液とします。

❖ DNA抽出後のサンプル溶液は、反応チューブに添加するまで氷上で保存し、速やかに測定してください。

①

■寒天培地から滅菌綿棒を使いコロニーを採取。

②

■滅菌蒸留水に懸濁し、McFarland No.1 (3.0×10^8 CFU/mL) に調製する。

③

■さらに、滅菌蒸留水で100倍に希釈する。菌希釈液は3.0×10^6 CFU/mLに調製される。

50μL

LAMP法

④,⑤


④,⑧


⑥


⑦


⑨


⑨


図9．検査の流れ

III. 試薬の調製　IV. 試薬分注およびサンプル溶液の添加

❑ 試薬の調製 [領域A]

❖ 操作は氷上でおこなってください。
❖ マスターミックスは検査毎に調製し、作り置きはしないでください。調製後は氷上で保存し、速やかに使用してください。
❖ 必要量を採取した残りの試薬は、速やかに凍結保存してください。

【操作は領域Aで行います。】

① -20°Cで保存していた*Bst* DNA Polymerase以外のキット試薬を室温で解凍し、使用するまで氷上で保存します。 *Bst* DNA Polymeraseはそのまま氷上で保存します。

② 融解したReaction Mix. VT1 (RM V1) およびReaction Mix. VT2 (RM V2) は、使用前にタッピングにて混合しスピンダウンを行います。*Bst* DNA Polymeraseは、スピンダウンのみ行います。

❖ *Bst* DNA Polymeraseは、失活の恐れがあるため混合しないでください。

③ 別途用意した1.5mL滅菌チューブに、RM V1と*Bst* DNA Polymeraseを分注します。同様に、RM V2と*Bst* DNA Polymeraseを分注します。
- 各試薬1テストあたりRM V1 (または RM V2) 20μL、*Bst* DNA Polymerase 1μLを、陽性・陰性コントロールを含めた必要なテスト数分分注します。

❖ *Bst* DNA Polymeraseは、採取量が微量であるため、まずRM V1 (またはRM V2) をチューブに採取し、次に*Bst* DNA Polymeraseをチップの共洗いにより、混ぜてください。

④ 転倒混和あるいはボルテックスミキサー (1秒間×3回) により十分混合した後、スピンダウンし、マスターミックスとします。

❖ マスターミックスをボルテックスミキサーで混合する場合は、1秒間×3回を厳守してください (過度な混合は酵素失活の恐れがあります) 。

マスターミックスの調製分量

テスト数	1test	____tests
Reaction Mix. VT1 または Reaction Mix. VT2	20μL	20μL× ____ = ____μL
Bst DNA Polymerase	1μL	1μL × ____ = ____μL
Total	21μL	21μL× ____ = ____μL

❑ 試薬分注およびサンプル溶液の添加 (図10) 【領域A･C】

❖ 操作は氷上でおこなってください。
❖ マスターミックスを分注する前に、反応チューブにヒビ･キズ等がないことを目視で確認してください。

【操作は領域Aで行います。】

① 陽性コントロールとしてキット添付のControl DNA VT1 (Cont V1) 、Control DNA VT2 (Cont V2) 、および陰性コントロールとしてExtraction Solution for Foods (EX F) を予め準備しておきます。

❖ <u>陰性コントロールとして使用する EX Fは、試薬開封の際に100μL程度マイクロチューブに分取し、</u>陰性コントロール専用として領域Cにて使用、保存します。

② 試薬調製用のクリーンベンチ内でLoopamp®反応チューブにそれぞれマスターミックスを20μLずつ分注し、すべてのキャップを閉じます。
- コンタミネーションを避けるため、マスターミックスの分注後は、一旦反応チューブのキャップを軽く閉じてください。

【操作は領域Cで行います。】

③ マスターミックス20μLが分注されている反応チューブにサンプルを5μLずつ添加し、ピペッティングで十分に混和します。
- Cont V1およびCont VT2は大量のDNAを含むため、取り扱いには十分注意してください (使用前にはスピンダウンを行ってください。反応チューブへの添加は最後に行ってください) 。
- サンプルの添加は、コンタミネーションを避けるため、陰性コントロール (EX F) 、サンプル溶液、陽性コントロール (Cont V1またはCont V2) の順で行うことをお勧めします。
- サンプル溶液を添加する際は、沈渣を持ち込まないよう、上清を採取してください。
- ピペットの汚染を防ぐため、吸引操作はゆっくりおこなってください。
- コンタミネーションを避けるため、サンプル添加後はしっかりとキャップを閉めてから、次のサンプルを添加してください。

④ キャップを閉め、スピンダウンします。

⑤ スピンダウン終了後にはチューブ内に気泡がないことを確認してください。
- 反応液中に気泡ができた場合は、スピンダウンで取り除いてください。マスターミックス調製は、氷上で操作を行ってください。





図10. 試薬分注
およびサンプル溶液の添加

V.　LAMP反応および検出

❑ LAMP反応および検出［領域D］

◆ LAMP反応および検出はリアルタイム濁度測定装置にておこないます。LAMP反応条件は65℃60分間、その後反応停止条件として80℃、2分間とします。

① 使用する20分前までに電源を入れ装置を立ち上げてください。

▧ 検体の前処理を始める前に、パラメーターを選び、あらかじめ測定機器を加温状態にしてください。

② 反応チューブを測定機器にセットする際は、チューブにヒビ・キズ等がないこと、ブロックが測定温度になっていることを確認後、キャップの開け口を手前にセットし、チューブのキャップが全てしっかりと閉まっていることを確認してください。

③ 反応チューブを検出部に入れる際は、チューブ内に気泡がないことを確認してください（気泡があると、誤った判定の原因となります）。

④ 反応チューブを測定機器にセット後は、速やかに測定開始してください（LAMP法は等温で反応が進行するため、セットした時点から反応は始まっています）。

◆ LA-320C（図11）

① 本体がパソコンに接続されていることを確認し電源を投入してください。

② パソコンを起動し「LA-320C制御ソフト」を起動してください。

③ 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください。）。

④ 予備加熱終了後、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。

◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実におこなってください。

⑤ [測定開始]を確実にクリックし測定を開始します。

◇ [測定開始]をクリックしないとデータが保存されず、判定ができなくなってしまいます。

⑥ 32チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。

❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。

◆ RT-160C（図12）

① 本体の電源を投入してください。

② 測定条件を設定します（各試薬のパラメーター表を参照してください。パラメーター表は弊社担当者に御要請ください。）。

③ 予備加熱終了後 、サンプルを測定部にセットし、ホットボンネットを閉めてください。

◇ 反応チューブの確認（ヒビ・キズ、気泡等）を確実におこなってください。

④ [Start/Heat]ボタンを押し、測定を開始します。

⑤ 16チューブそれぞれの濁度を測定し、モニターに増幅曲線、判定補助画面を表示します。

❖ 詳しくは、添付の取扱説明書をご覧ください。

❖ 反応開始後は、測定機器のフタ（ホットボンネット）を開けないでください。

❖ 反応後のチューブを検出部から取り出す際はチューブを破損しないように慎重に取り扱ってください。また反応チューブのキャップは、決して開けないでください。増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因になるだけではなく、試験環境を汚染し、汚染を除去しない限り、以後の試験で正しい結果が得られなくなる可能性があります。





図11.　LAー320C本体（上）とサンプル測定部（下）





図12.　RTー160C本体（上）とサンプル測定部（下）

VI. 結果判定

❏結果判定【領域D】

◆判定の前に（図13）

判定の際には以下の点を確認した上で実施してください。

- 陽性コントロール、陰性コントロールの反応が適切に進行している。
  - ◇正常な反応が行われている場合、陽性コントロール、陰性コントロールおよび検体の増幅曲線は図13のようなパターンを示します。
  - ◇陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していなければ、LAMP反応は正常に進行しています。
- 増幅モードの増幅曲線による濁度上昇の有無。

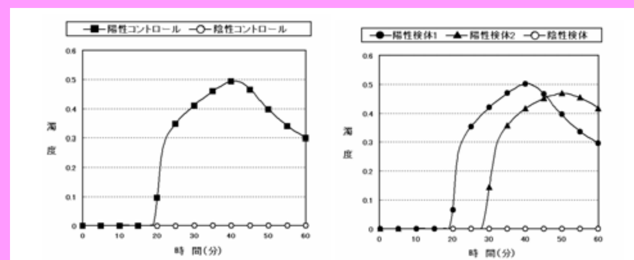


**図13. コントロールの増幅曲線パターン（左）
検体の増幅曲線パターン（右）**

◆LA-320C（図14）

①増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します（縦軸：Abs、横軸：時間）

②判定モード

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します（縦軸：微分値、横軸：時間）。

③結果モード

- 測定結果を棒グラフで表示し、判定カードの色で判定結果の確認ができます。
- 陽性ー赤、陰性ー緑、測定中ー黄　（青ー増幅分）

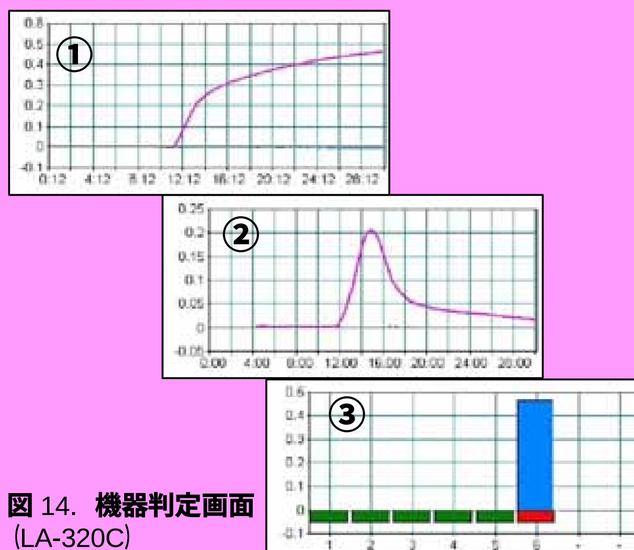


図 14. 機器判定画面（LA-320C）

◆RT-160C（図15）

①増幅モード

- 反応の増幅曲線を示します(縦軸：Abs、横軸：時間)。

②微分グラフ表示

- 測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示します（縦軸：微分値、横軸：時間）。

③数値表示

- 測定結果を吸光度、立上り時間、判定で表示します。

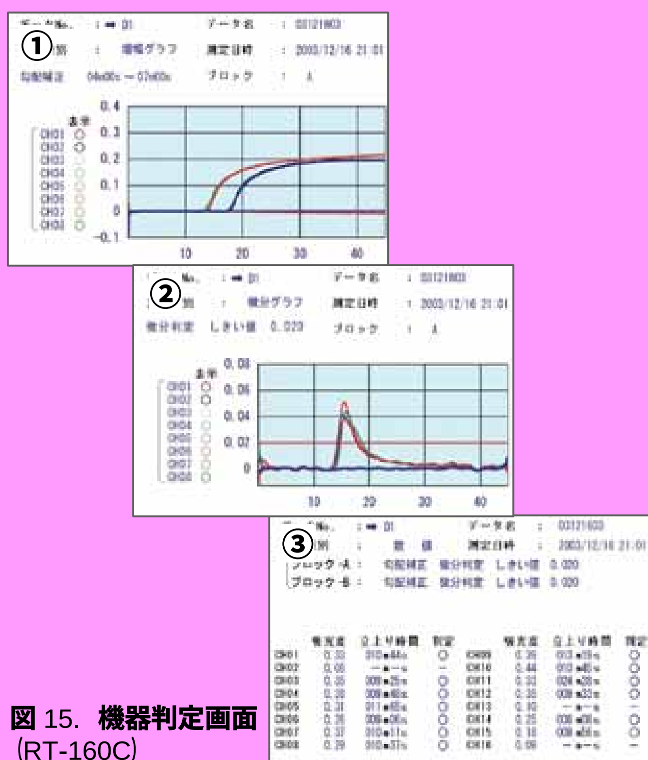
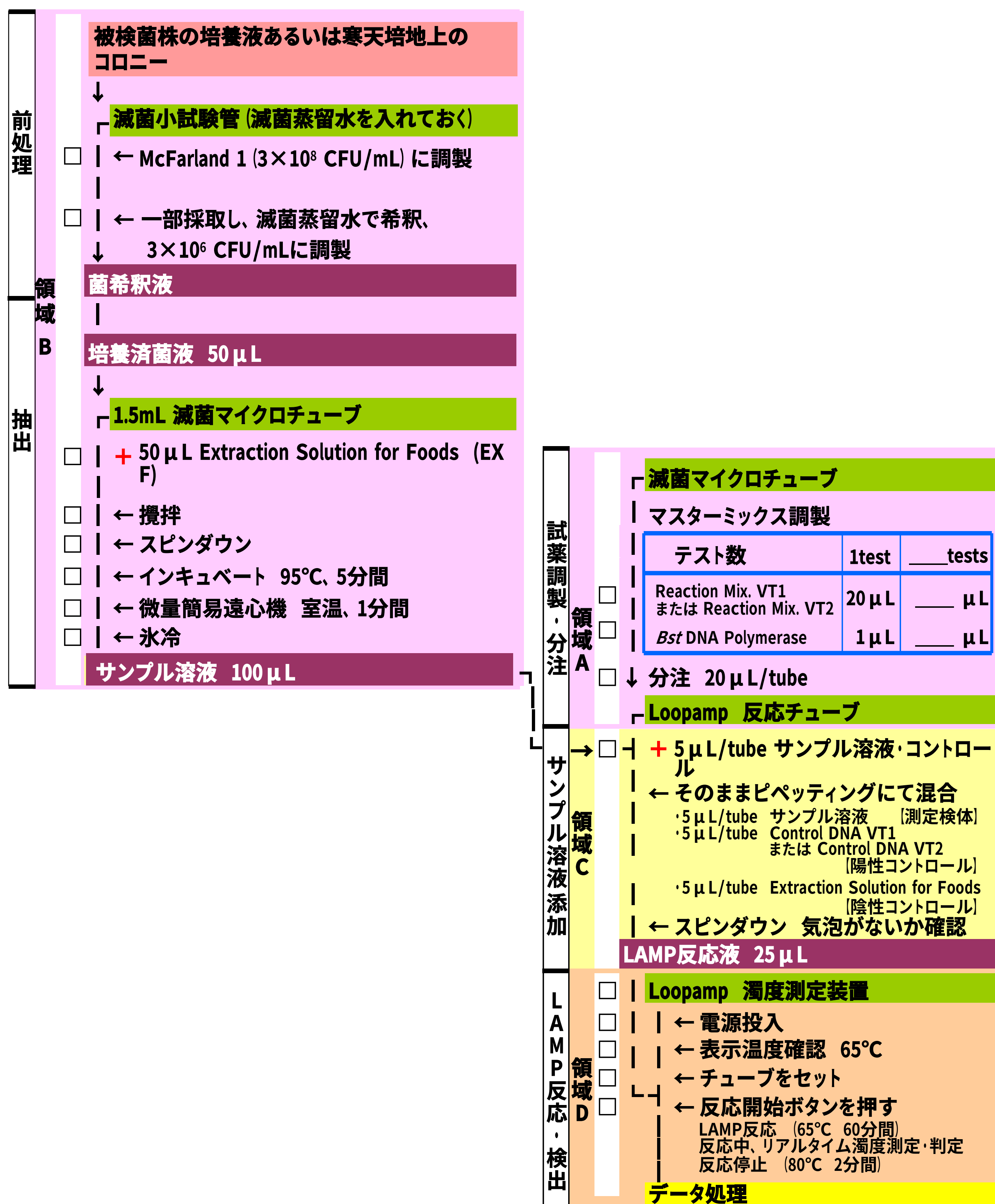


図 15. 機器判定画面（RT-160C）

◆注意事項

- 上記装置による判定は陽性／陰性を確定するものではありません。あくまでも判定を補助するための機能です。
- 最終的な結果判定は、陰性／陽性コントロールを比較対象とし増幅曲線で濁度の上昇を確認することによって行ってください。
- 詳細内容および上記以外の装置およびLAMP法試薬を用いての判定に関しては、各機器・試薬の取扱説明書・添付文書をご確認ください。

VII. 検査フローチャート



Ⅳ. アッセイシート

DATE		KIT NAME		Lot. No.	
ASSAY Profile				SHEET No.	

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8

Position	Profile
A1	
A2	
A3	
A4	
A5	
A6	
A7	
A8	
B1	
B2	
B3	
B4	
B5	
B6	
B7	
B8	
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	
C6	
C7	
C8	
D1	
D2	
D3	
D4	
D5	
D6	
D7	
D8	


memo